UNIVERSITE DE REIMS

FACULTE de MEDECINE

Etablissement public à caractère scientifique et culturel

Année 1971

N° 35

THESE
DE
DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)
par

CANDAS JEAN-CLAUDE, PIERRE

EXTERNE DES HOPITAUX DE REIMS

NÉ le 25 MARS 1942 à TROYES

Présentée et soutenue publiquement le 22 SEPT. 1971

INTERET DE L'EVALUATION

DE L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIEE

LORS DE LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE.

Président : M. J.M. DUBOIS DE MONTREYNAUD, PROFESSEUR

UNIVERSITE DE REIMS

FACULTE DE MEDECINE

Etablissement public à caractère scientifique et culturel.

ANNEE : 1971 N° 35

THESE

DE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

CANDAS Jean-Claude, Pierre, Jacques

Externe des Hôpitaux de Reims

Né le 25 Mars 1942 à Troyes

Présentée et soutenue publiquement le 22 SEPT. 1971 1971

INTERET DE L'EVALUATION DE L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIEE LORS DE LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

PRESIDENT : M. Jean-Marie DUBOIS de MONTREYNAUD, Professeur.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE REIMS

FACULTE DE MEDECINE

Etablissement public à caractère scientifique et culturel

Directeur honoraire de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de REIMS ..... M. R. FRANQUET

Doyens honoraires de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de REIMS ..... M. L. VILDE
M. H. EZES

Professeurs honoraires ..... MM. A. JACQUINET
M. LEULIER
R. LEFEVRE

Doyen, Président de l'E.P.C.S.C. ..... H. GEOFFROY

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.

J. BASTIEN ..... Clinique chirurgicale

J. BOREL ..... Biochimie médicale

H. CHOISY ..... Pharmacologie

G. DROPSY ..... Bactério-Viro-Immunologie

J.M. DUBOIS DE MONTREYNAUD ..... Pathologie expérimentale

H. EZES ..... Clinique obstétricale

M. FANDRE ..... Clinique de pédiatrie et de puériculture

H. GEOFFROY ..... Pathologie médicale

P. QUEREUX ..... Anatomie

J. RIVES ..... Pathologie chirurgicale

J. VALEYRE ..... Biophysique médicale

L. VILDE ..... Clinique médicale

D. ZAGURY ..... Histologie-Embryologie

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.

T. CAULET ..... Anatomie pathologique

R. NATAF ..... Ophtalmologie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542719_0016

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

G. BOFFA ..... Biochimie médicale

P. GAUGE ..... Physiologie

Y. GERARD ..... Chirurgie générale

G. PETIT MAIRE ..... Hygiène, médecine préventive et médecine du travail

J. RISTELHUEBER ..... Thérapeutique

PROFESSEURS CHARGES DE COURS A TITRE PERMANENT

MM.

M. JACQUET ..... Anatomie pathologique

R. LARDENNOIS ..... Pathologie chirurgicale

MAITRES DE CONFERENCE AGREGES

MM.

JJ. ADNET ..... Anatomie pathologique

A. BAJOLET ..... Cardiologie

J. BOY ..... Hématologie

A. CATTAN ..... Cancérologie

R. COFFIN ..... Pédiatrie

P. COUDOUX ..... Médecine générale

G. DELTOUR ..... Biophysique

J. DEVILLE ..... Médecine interne

M. DUFOUR ..... Médecine générale

J. GOUGEON ..... Médecine générale

F. GUYOT ..... Neuro - chirurgie

M. HARDEL ..... Cardiologie

S. KOCHMANN ..... Pneumo-phtisiologie

M. LEUTENEGGER ..... Médecine générale

J. MORICE ..... Neuro-psychiatrie

H. NICAISE ..... Chirurgie-générale

S. PAROT ..... Physiologie

G. PASCALIS ..... Neuro-psychiatrie

F. PENNAFORTE ..... Pédiatrie

M. RANDOUX ..... Chimie biologique

Melle J. RENDOING ..... Anesthésiologie

M. SEGAL ..... Electroradiologie

P. WAHL ..... Gynécologie et Obstétrique

P. ZEITOUN ..... Histologie-Embryologie

Secrétaire : R. DOHAIN

Bibliothécaire : J.PITROIS

Par délibération en date du 9 Février 1968, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

Dans le cadre du Service de Pneumo-Phtisiologie et de la Chaire de Médecine Expérimentale du Centre Hospitalier Universitaire de Reims, j'ai apprécié l'aide du Professeur J.M. DUBOIS de MONTREYNAUD et du Professeur Agrégé S. KOCHMAN qui a bien voulu diriger mon travail.

J'ai pu bénéficier des installations du Service des Isotopes du Centre Régional de lutte contre le Cancer, l'Institut J. GODINOT, grâce au Professeur J. VALEYRE et au Professeur Agrégé G. DELTOUR. Je les en remercie.

Je remercie également pour leurs précieux conseils le Professeur G. DROPSY et le Professeur Agrégé J. BOY.

A mes Maîtres du Centre Hospitalier Universitaire de Reims :

Monsieur le Docteur P. [illegible],
Monsieur le Professeur M. [illegible]
Monsieur le Professeur J.M. DUBOIS de MONTREYNAUD,
Monsieur le Professeur [illegible],
Monsieur le Docteur L. [illegible]

Qui m'ont accueilli dans leur service durant mon externat. Je les en remercie.

A mes Parents

En témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

A ma Femme, à mon Fils

En témoignage de mon amour et de mon affection

A toute ma Famille

En témoignage de mon attachement.

A mes Amis.

I N T R O D U C T I O N

Le test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) permet d'interroger, " in vitro ", la mémoire immunitaire du lymphocyte.

Les travaux réalisés par B.N. HALPERN et son école (4) (8) ont montré le très grand intérêt de ce test dans le diagnostic de l'hypersensibilité retardée et dans l'allergie médicamenteuse ; la transformation blastique est appréciée par la méthode optique maintenant très bien codifiée, mais dont on connaît aussi les inconvénients : difficulté du comptage des cellules transformées, lenteur de la lecture nécessitant un oeil averti.

Il nous a paru intéressant de comparer, pour la lecture du test, la méthode optique et la méthode isotopique utilisant la thymidine tritiée. Nous avons employé comme agent stimulant la phytohémagglutinine à diverses dilutions.

Dans un premier temps nous rappellerons les principes du test de transformation lymphoblastique, en nous référant à des travaux récents ; puis nous décrirons les méthodes de lecture, la méthode optique d'une manière succincte et la méthode isotopique d'une façon détaillée. Nous montrerons l'intérêt de cette dernière.

PRINCIPES DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Décrit en 1865, par SCHULZER, le lymphocyte fut longtemps considéré comme une cellule de peu d'intérêt du fait de sa structure apparemment rudimentaire et de l'absence de toute fonction phagocytaire.

Depuis les travaux de MUELLER, WOLFF et MEYER, (IO) on sait que les lymphocytes des organismes supérieurs appartiennent en fait à deux lignées différentes, bien qu'aucun caractère cytologique ne permette de les opposer. On distingue en effet les lymphocytes thymodépendants, à durée de vie plus longue, qui sont le support de la mémoire immunitaire et des réactions d'hypersensibilité retardée et les lymphocytes bursodépendants, responsables des réactions immunitaires de type immédiat.

L'étude soigneuse des déficits immunitaires néo-nataux chez l'homme cadre admirablement avec cette dualité d'origine et de fonction et confirme de façon pratiquement expérimentale le rôle majeur des lymphocytes dans toutes les réactions d'immunité.

La pénétration d'un antigène dans l'organisme alerte des lymphocytes " relais " toujours thymodépendants (MOSIER et COPPLESON)(9) qui transmettent à leur tour l'information aux lymphocytes immunocompétents burso ou thymodépendants selon le type de réaction.

Ces lymphocytes, quelle que soit la lignée incriminée, évoluent alors vers des formes jeunes de type blastique, à haut potentiel de multiplication, qui se transforment en

cellules [illegible] ou lymphocytaires, support de la réponse immunitaire. Une telle transformation lymphoblastique peut s'observer " in vitro " en ajoutant l'antigène au milieu de culture des lymphocytes. ( )

On peut aussi provoquer une transformation lymphoblastique en ajoutant au milieu de culture de la phytohémagglutinine.

La phytohémagglutinine est une protéine non toxique, extraite du haricot rouge, " phaseolus vulgaris ", et qui possède une très grande action stimulante sur les lymphocytes.

Il existe deux sortes de phytohémagglutinine :

La phytohémagglutinine M (P H A - mucoprotéine), ou P H A - M, que nous utilisons, a été originellement préparée par RIGAS et OSGOOD (IX) ; elle est obtenue en traitant la fraction soluble d'un extrait de phaseolus vulgaris (ou phaseolus communis) avec de l'éthanol à la concentration de 30 p. 100. Le surnageant est repris par l'éthanol à 75 p. 100 et l'on obtient ainsi un précipité qui, après dissolution et reprécipitation par le sulfate d'ammonium, est dialysé et lyophilisé.

Une autre agglutinine obtenue du même haricot, contient plus de protéines et moins d'hydrates de carbone et est appelée phytohémagglutinine P (P H A - protéine) ou P H A - P. Elle est préparée par précipitation au sulfate d'ammonium des extraits solubles de farine de haricot.

Le mode d'action de la phytohémagglutinine sur les lymphocytes a fait l'objet de travaux récents (SCHUMACHER et Coll.) (I2). Il existe trois fractions principales de la phytohémagglutinine, I, II et III, obtenues par chromatographie par échange d'ions sur Sephadex C 50 ; seules les fractions II et III présentent une activité biologique ; la fraction II est responsable de l'activité lymphoagglutinante ; la fraction III contient en égale importance les activités lympho et érythroagglutinantes. Enfin les fractions II et III présentent, mélangées, l'activité agglutinante, l'effet mitogène et l'activité cytotoxique. Ceci démontre qu'une substance active, supposée être la lymphoagglutinine, doit être présente dans les deux fractions.

La fraction II se décompose en une fraction IIa et une fraction IIb. La fraction IIa possède chez l'homme une activité lymphoagglutinante et la fraction IIb contient en plus une certaine activité érythroagglutinante. La fraction IIa agglutine toutefois les globules rouges du porc et du cheval. Pour éliminer cette activité érythroagglutinante, une absorption sur globules rouges de porc est nécessaire. On peut alors définir sept autres fractions grâce à l'électrophorèse à l'équilibre. L'étude biologique de ces fractions montre une très haute activité lymphoagglutinante de la fraction VI, tandis que l'effet mitogène le plus fort est dû à la fraction V.

La caractérisation physico-chimique de ces fractions actives sur gel de polyacrylamide montre seulement un composé dans la fraction VI et deux composés dans la fraction V.

Par immunoélectrophorèse, développée avec un sérum de lapin anti - PHA, la fraction VI donne une ligne de précipitation

en direction de la cathode. Cette ligne semble correspondre à la lymphoagglutinine isolée par WEEKS.

L'existence de deux fractions avec des points isoélectriques différents, mais une activité biologique identique, indique que la phytohémagglutinine contient deux lymphoagglutinines différentes avec des propriétés physico-chimiques très semblables, les différences de ces fractions concernant la lymphoagglutination, l'effet mitogène et la cytotoxicité étant très minimes.

Les différentes fractions actives de la phytohémagglutinine étant définies, sur quels constituants du lymphocyte ces fractions agissent-elles ?

Dans un travail récent, DRINGS (2) a pratiqué des cultures de lymphocytes avec ou sans addition de phytohémagglutinine et a mesuré les fractions de la chromatine des noyaux des lymphocytes en début d'expérience et après 24 heures d'incubation.

L'auteur utilise la méthode de FREUSTER et Coll. pour isoler du noyau les différentes fractions constituant la chromatine ; c'est ainsi que par centrifugation différentielle, il obtient successivement une fraction riche en hétérochromatine, puis la fraction intermédiaire comprenant un mélange d'hétéro et d'euchromatine et enfin une troisième fraction riche en euchromatine. Le pourcentage de l'ADN dans les différentes fractions est mesuré et donné en fonction de l'ADN total.

Les résultats obtenus ont montré que, par stimulation par la phytohémagglutinine, l'euchromatine des lymphocytes augmente après 24 heures d'incubation ; dans les conditions d'expérience de DRINGS, 39,5 p. 100 de l'ADN sont retrouvés dans la fraction d'euchromatine avant stimulation. Après 24 heures de stimulation,

le pourcentage de l'ADN passe à 52,I p. IOO (dans les cultures témoins non stimulées, le pourcentage passe seulement de 43,9 p. IOO à 46,8 p. IOO).

Parallèlement à l'augmentation d'euchromatine, la fraction d'hétérochromatine chute de 33,2 p. IOO à 24,4 p. IOO après 24 heures de stimulation par la phytohémagglutinine (la fraction d'hétérochromatine reste inchangée dans les cultures non stimulées avec 24,4 p. IOO et 24 p. IOO). Ceci s'explique par une continuelle décondensation de l'hétérochromatine pendant la transformation des lymphocytes, phénomène étudié par bon nombre d'auteurs.

En conclusion, la phytohémagglutinine entraîne une "euchromatisation " des lymphocytes en cultures.

TECHNIQUE DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Nous allons exposer maintenant les techniques concernant la préparation des cultures de lymphocytes et leur stimulation par la phytohémagglutinine. Nous aborderons ensuite les méthodes de lecture des résultats obtenus.

La technique de préparation des cultures de lymphocytes que nous allons employer est celle décrite par HUGHES et CASPARY (5) inspirée des travaux antérieurs de COULSON et CHALMERS.

On prélève stérilement 50 ml de sang dans des flacons contenant 0,5 ml d'héparinate de calcium.

On fait passer ce sang dans une colonne de verre contenant

3 g de coton hydrophile ou de laine de verre, ayant la propriété de retenir les polynucléaires.

Le filtrat débarrassé ainsi de ses polynucléaires est placé à 37° pendant 45 minutes afin d'accélérer la sédimentation des globules rouges. Le surnageant, qui contient les lymphocytes, est alors prélevé, placé dans des tubes de 10 ml, et additionné de milieu de culture 199, afin d'obtenir une dilution finale de 2×10^6 lymphocytes par ml pour un volume total de 3 ml, et ce, sans antibiotique et à un pH de 7,2 par addition de sérum bicarbonaté isotonique stérile à 14 p. 1000.

Les cultures de lymphocytes ainsi obtenues sont divisées en deux échantillons : l'un de ces échantillons, qui sert de témoin, ne contient que le milieu nutritif, alors que l'autre est additionné de la substance induisant la transformation lymphoblastique, c'est-à-dire la phytohémagglutinine . on ajoute alors aux tubes de culture 0,1 ml de phytohémagglutinine à diverses dilutions 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 et 1/10. Les tubes témoins et les tubes additionnés de phytohémagglutinine sont ensuite placés à l'étuve à 37° pendant 96 heures.

Au bout de ce temps, on doit estimer et comparer la transformation lymphoblastique, spontanée des cultures témoins et celle qui est induite par la phytohémagglutinine ; on peut le faire par deux méthodes : la méthode optique et la méthode isotopique.

MÉTHODES DE LECTURE

Comme nous l'avons vu, les lymphocytes mis en présence d'un allergène ou de phytohémagglutinine, évoluent vers des formes jeunes de type blastique, à haut potentiel de multiplication ; cette transformation et cette multiplication cellulaire s'accompagnent de la synthèse de nouvelles molécules d'ARN.

Le but des deux méthodes de lecture est de permettre la mesure de la masse et du pourcentage des cellules transformées, soit directement, par coloration des dites cellules (méthode optique), soit indirectement, par marquage de l'ADN (méthode isotopique).

LA METHODE OPTIQUE comprend dans un premier temps la coloration au MAY - GRUNWALD - GIEMSA d'une goutte du culot de suspension, étalée sur une lame.

Les lames sont lues avec un objectif à immersion, en dénombrant, sur 1500 éléments, la proportion de formes intermédiaires, de formes blastiques et de mitoses.

Rappelons succinctement les caractéristiques des cellules à différencier :

La reconnaissance du petit lymphocyte et du lymphoblaste est aisée :

- le petit lymphocyte a une petite taille (8 à 9 microns) un noyau régulièrement ovalaire, quelquefois un peu incurvé, très dense, violet foncé, composé de masses chromatiniennes très combres ; il occupe les 9/10^{e} ou plus de la superficie cellulaire ; son cytoplasme très réduit, est souvent peu visible ; ses contours seuls sont teintés en bleu ciel ; il s'étend souvent d'un seul côté du noyau ; souvent le noyau est picnotique et le cytoplasme, inexistant ou réduit à un très mince filet bleu, coiffe le noyau à la manière d'un bonnet phrygien (BERNARD et BESSIS) (I);

- le lymphoblaste, au contraire, a une taille volumineuse (environ 15 microns) ; son noyau est arrondi ou ovalaire, central, de grandes dimensions, de coloration rose clair ; il contient un ou deux nucléoles, dont un des caractères propres est la pâleur de leur coloration bleue. Le cytoplasme du lymphoblaste est basophile, souvent teinté plus fortement sur les bords.

Il est plus difficile de reconnaître les formes intermédiaires et les mitoses, les caractères de distinction avec les autres cellules étant moins nettes.

Nous obtenons par la méthode optique un résultat chiffré en pourcentage de cellules transformées, pourcentage qui devient significatif lorsqu'il atteint 6 p. IOO, les transformations dans le tube témoin ne devant pas dépasser I p. IOO.

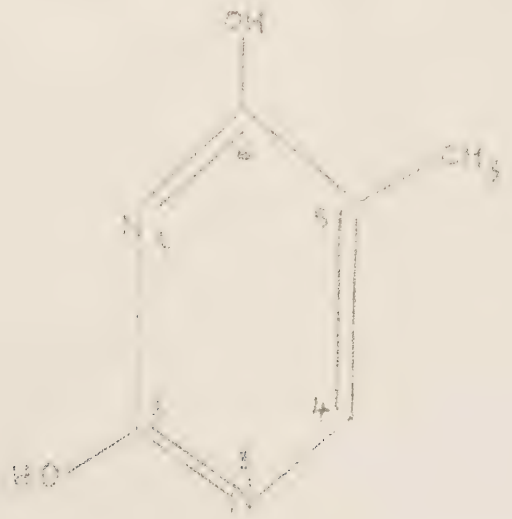
La méthode optique, remarquable de sensibilité et de précision, présente des inconvénients pratiques : cela tient au comptage toujours délicat des cellules colorées (la "frontière" entre les cellules non transformées, les cellules transformées et les formes intermédiaires n'est pas toujours facile à préciser). C'est aussi une méthode longue et minutieuse.

Le principe de la METHODE ISOTOPIQUE est basé sur le fait que, lors de la transformation lymphoblastique, il y a duplication cellulaire, donc synthèse de nouvelles molécules d'ADN ; la méthode isotopique va donc consister à marquer ces molécules d'ADN nouvellement élaborées par l'incorporation de thymidine radio - active (thymidine tritiée) et ensuite à réaliser le comptage des cellules ainsi marquées par scintillation en phase liquide.

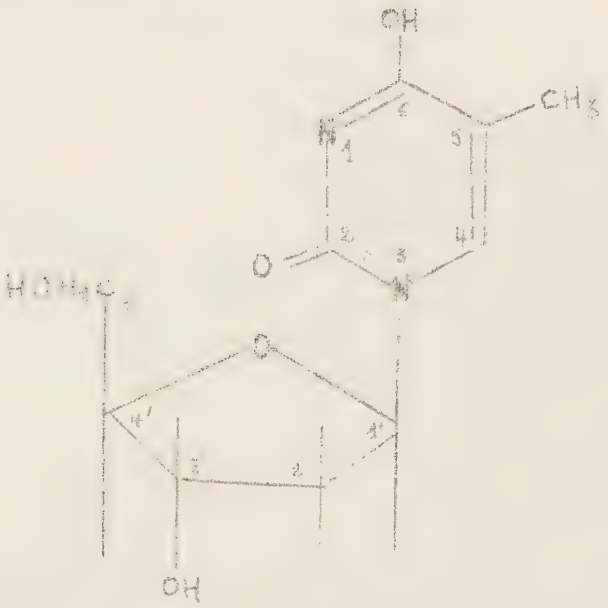
La méthode nécessite l'emploi de la thymidine, du tritium et du comptage par scintillation, sur lesquels nous allons revenir.

La thymidine est l'union de la thymine avec un sucre : le 2 - désoxyribose. (6)

La thymine permet de différencier l'ADN de l'ARN : dans l'ARN, la cytosine est couplée à la guanine, l'adénine est liée à l'uracile ; par contre, dans l'ADN, la cytosine est certes toujours couplée à la guanine, mais l'adénine, elle, est liée à la thymine. Nous voyons donc que seule la thymine est spécifique de l'ADN, ce qui en justifie le choix.

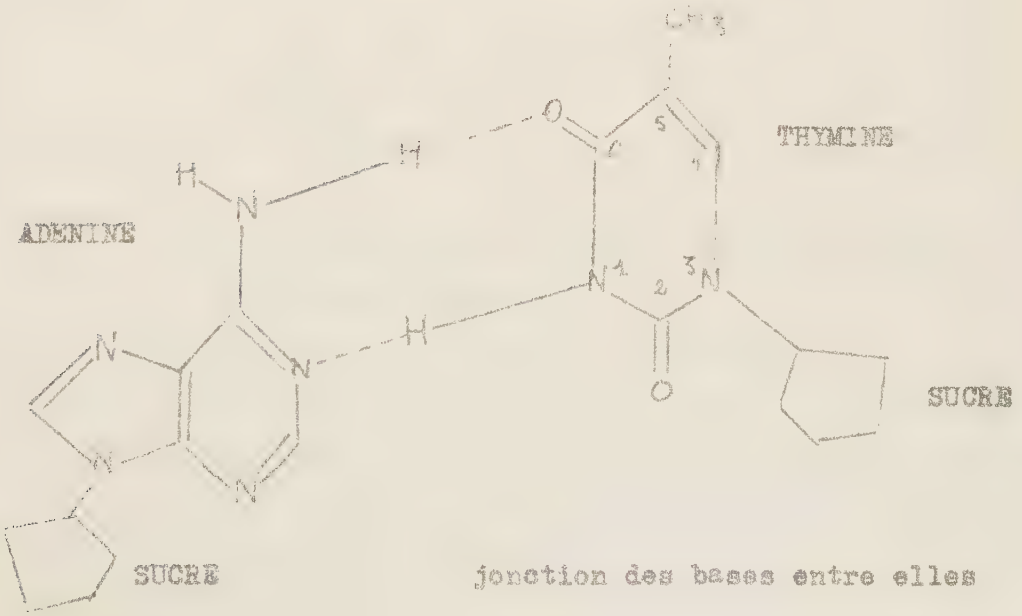


THYMINE



THYMIDINE

La thymidine s'incorpore plus aisément dans la molécule d'ADN que la thymine simple ; la thymidine, nucléotide, (base + sucre), molécule plus élaborée, plus complète, " pénétrera " plus directement dans l'ADN. L'incorporation se fait, d'une part par l'appariement de la base (thymine) avec la base correspondante (adénine) et d'autre part par la jonction des sucres entre eux. (6)



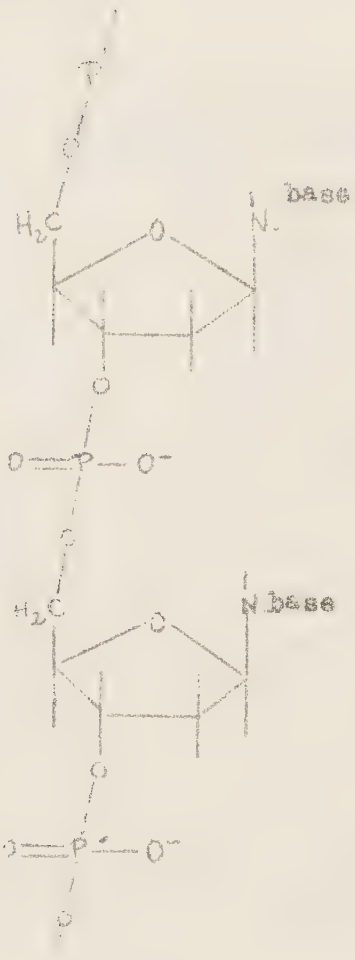
ADENINE

THYMINE

SUCRE

SUCRE

jonction des bases entre elles



jonction des sucres entre eux

En ce qui concerne le marquage de l'ADN nous aurions pu utiliser :

- du phosphore 32 (^{32}P)
- du carbone 14 (^{14}C)
- du tritium (^{3}H)

Trois grandes raisons imposent le choix du tritium :

- il est plus économique ;
- il est moins dangereux à manipuler :

  le rayonnement émis par le tritium sous forme de rayons bêta est moins dangereux que celui émis par le carbone 14 ou par le phosphore 32. Le tableau suivant l'indique clairement :

Rayonnement émis par :		
Phosphore 32	Carbone I4	Tritium
1,71 Mev.	0,158 Mev.	0,0186 Mev.

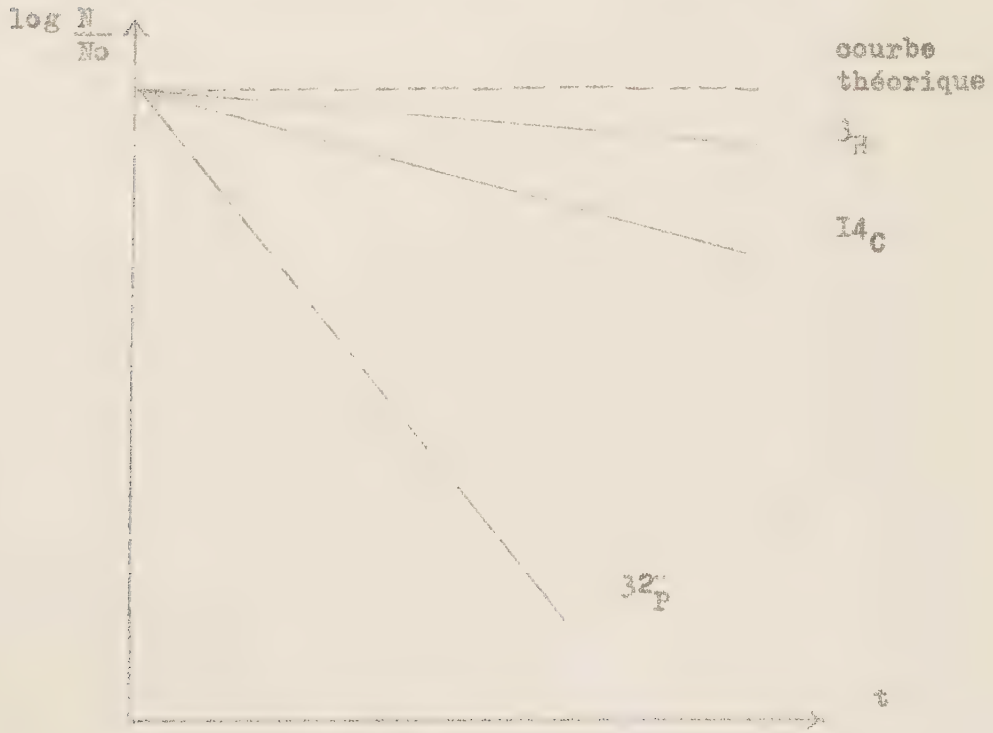
- enfin le tritium donne peu de cytolyse ("effet suicide") :

des expériences ont été faites sur des bactéries dont l'ADN était marqué par le phosphore 32, par le carbone I4 et par le tritium ; la cytolyse correspond au nombre de bactéries détruites en un temps donné. Cet effet est appliquable aux lymphocytes.

Considérons la figure suivante :

Soit No : le nombre de bactéries au début de l'expérience

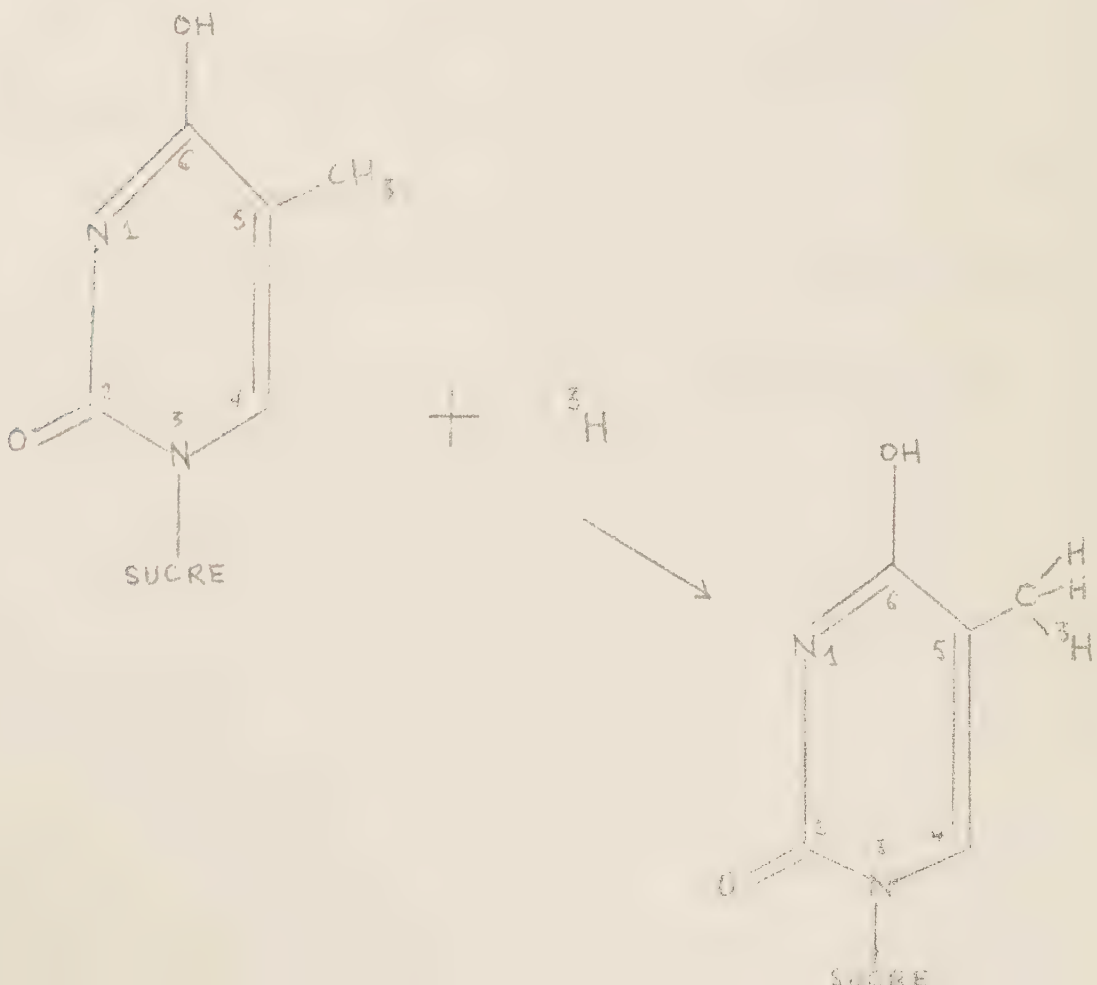
Soit N : le nombre de bactéries à un temps donné



Nous voyons d'après la figure ci-dessus que le phosphore 32 donne le plus de cytolyse ; en effet le phosphore 32 se fixe sur les " arêtes " de l'ADN ; lors de sa désintégration il provoque une rupture de l'arête sur laquelle il est fixé, ce qui entraîne la mort de la bactérie.

Le carbone I4 donne moins de cytolyse que le phosphore 32 ; quant au tritium, qui est fixé sur la thymidine il en donne encore moins, d'où son grand intérêt dans le marquage de l'ADN sans perturber en rien la cinétique de multiplication d'une culture cellulaire.

Le tritium est fixé sur la thymidine, sur le méthyl (CH_3) en 5 ; il prend la place d'un hydrogène du méthyl.



Nous avons utilisé la méthode de comptage par scintillation en phase liquide parce que le tritium est un émetteur de rayons bêta mous et que la scintillation en phase liquide est désormais la pratique la plus répandue de comptage des émetteurs de bêta mous.

C'est après l'invention du tube photomultiplicateur, que H. KALLMAN et G.T. REYNOLDS ont trouvé que ces tubes pouvaient être utilisés pour le comptage des émetteurs de bêta mous, dissous dans un scintillateur liquide. En 1950 F.N. HAYES était le premier à exploiter cette métode pour le comptage de routine.

Sans entrer dans les détails de construction et de fonctionnement des compteurs à scintillation en phase liquide, nous pouvons signaler que les systèmes à deux photomultiplicateurs avec circuits de coïncidence sont les plus utilisés. Nous pouvons également donner les principaux avantages et inconvénients de cette méthode de comptage.

Les avantages sont les suivants :

- le grand rendement de détection : 50 à 60 p. 100 pour le tritium,
- la grande commodité et la souplesse de la méthode,
- l'équipement automatique moderne.

Comme inconvénients signalons :

- la complexité du matériel,

-le prix de revient au départ et de fonctionnement quotidien relativement élevé.

TECHNIQUE DE COMPTAGE PAR SCINTILLATION EN PHASE LIQUIDE

Nous décrirons brièvement cette technique, afin de mieux comprendre les différentes phases de la manipulation qui seront détaillées dans le protocole expérimental :

Dans la scintillation en phase liquide,

- le détecteur et l'échantillon sont mélangés ;
- le détecteur est un scintillateur ;
- le rendement des photons dans une solution standard de scintillateur est d'environ 5 photons par Kev. d'énergie bêta. Ainsi le tritium a une énergie moyenne d'environ 5,6 Kev. et une énergie maximale de 18 Kev. Les rendements par évènement radioactif seraient respectivement de 28 et 90 photons ;
- le tritium, comme tout émetteur bêta, a une énergie donnant une distribution continue avec une énergie maximale et moyenne caractéristique de l'isotope.

Les éléments du syatème sont :

- l'échantillon constitué par les cellules marquées par la thymidine tritiée, dissoute dans le solvant à l'aide d'un additif solubilisant : l'Hydroxyde de Hyamine ;

- les scintillateurs sont :
d'une part le P P O (2,5 - diphényloxazole), utilisé comme scintillateur " primaire ", dont les principales caractéristiques sont les suivantes :

Rendement des photons	Longueur d'onde	Solubilité dans le toluène	Prix
95 P. IOO Terphényl	3700 Å	bonne	modéré

le P P O est de loin le plus utilisé car il présente le meilleur compromis de prix et de performances. Mais la longueur d'onde du P P O est trop courte pour la meilleure réponse des photomultiplicateurs. Il est par conséquent nécessaire pour corriger cet état d'ajouter au mélange un deuxième scintillateur, appelé scintillateur " secondaire ".
Le scintillateur secondaire a la propriété de pouvoir absorber les photons émis par le scintillateur primaire et de les réémettre à une plus grande longueur d'onde, zone où la réponse du photomultiplicateur est plus sensible : tandis que le P P O émet à 3700 Å, zone où la réponse des photomultiplicateurs est faible, le composé P O P O P (I,4 - bis - 2 - (5 - phényloxazolyl) - benzène), le plus communément employé comme scintillateur secondaire, décale la longueur d'onde de 3700 Å

à 4250 Å dans une zone où la réponse est sensiblement améliorée. Le P O P O P n'est pas très soluble ce qui n'est pas obligatoire dans le cas d'un scintillateur secondaire. Le dérivé diméthyl-P O P O P émet approximativement à la même longueur d'onde tout en étant à peu près deux fois plus soluble ;

- le solvant est le toluène, de loin le plus utilisé ;

  ses principales caractéristiques sont :

  - son point de congélation bas (moins 70° C),
  - son point de combustion relativement haut,
  - sa faible toxicité,
  - son prix modéré,
  - il est facile à obtenir,
  - c'est un bon solvant,
  - son stockage est facile ;

- les récipients à échantillons que nous utilisons sont des flacons en polyéthylène (✱), moins chers que les flacons de verre ; ils présentent cependant l'inconvénient d'être attaqués par le toluène.

A signaler qu'il est fréquemment nécessaire de déterminer le rendement de détection afin de pouvoir calculer l'activité de l'échantillon en désintégration par minute ou de normaliser les échantillons les uns par rapport aux autres.

Trois méthodes courantes de calcul sont utilisées ; nous ne ferons que les citer :

✱ - BLOCH, Av. Iéna, PARIS, 16é -

- l'étalonnage interne,
- la méthode des rapport des voies,
- l'étalonnage externe.

Enfin, pour terminer, indiquons que, très souvent pendant les mesures de routine, le chercheur doit lutter contre les facteurs qui tendent à diminuer le rendement de détection et à déformer le spectre de l'isotope. Ces facteurs appelés " QUENCHING " peuvent être traduits en français par le mot " AFFAIBLISSEMENT ".

Cet affaiblissement empêche l'arrivée des photons au photomultiplicateur de différentes manières.

En tout cas, l'affaiblissement provoque une réduction du rendement de détection et un décalage du spectre vers l'énergie zéro. Dans le cas du tritium, qui est un émetteur faible, le décalage est parfois en même imperceptible, tandis que la diminution du rendement est très prononcée.

Pour mémoire, il existe deux grands facteurs d'affaiblissement que nous ne détaillerons pas :

- l'affaiblissement dû à la couleur,
- l'affaiblissement chimique ou thermique.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous avons prélevé chez des donneurs volontaires 50 ml de sang.

Nous avons réalisé les cultures de lymphocytes témoins et les cultures stimulées par la phytohémagglutinine (✱) en suivant scrupuleusement la méthode décrite ci-dessus.

Nous avons soumis les cultures de lymphocytes à l'action stimulante de la phytohémagglutinine non diluée et de la phytohémagglutinine diluée à I/2, I/3, I/4, I/5 et I/IO.

La lecture a été faite après 96 heures de culture, par les deux méthodes.

Par la méthode optique, après élimination soigneuse du surnageant du tube, une goutte du culot de suspension qui contient les lymphocytes, est étalée sur une lame préalablement lavée à l'alcool et, après sèchage, la coloration est effectuée au MAY - GRÜNWALD - GIEMSA.

La lecture est faite sur I500 éléments en dénombrant la proportion de formes intermédiaires, de formes blastiques et de mitoses.

✱ - Phytohaemagglutinin. DIFCO Laboratories, Detroit, Mich. U.S.A.

Par la méthode isotopique, on ajoute au milieu de culture 2,5 microcuries de thymidine tritiée (✱) (activité spécifique : 5 curies/mmole) dans 0,5 ml de milieu I99 pour obtenir une concentration finale de 0,555 microcurie/ml ; on mélange et on laisse incuber pendant I2 heures.

Au bout des I2 heures, les tubes sont centrifugés (450 g pendant 7 minutes à 4° C) et le surnageant est récupéré.

Les cellules sont lavées trois fois dans 6 ml de Parsker I99 (✱✱) (centrifugation à 450 g pendant 7 minutes à 4° C).

ADN et protéines sont précipités avec 2 ml d'acide trichloracétique à 5 p. I00, froid, après addition d'une goutte de sérum humain pour amorcer la précipitation.

Après centrifugation (450 g pendant 7 minutes à 4° C) et récupération du surnageant, le précipité est lavé avec 2 ml d'acide trichloracétique.

Finalement le précipité est déshydraté après passage dans 2 ml d'alcool absolu froid, centrifugé et ensuite dissous dans 0,5 ml d'hydroxyde de hyamine (✱✱✱) où il est laissé une nuit à 37° dans les tubes fermés ; les produits dissous sont transférés dans des flacons à scintillation utilisant deux volumes de 5 ml de liquide de scintillation, 5g de P P O et 0,4g de P O P O P dans I l de toluène.

✱ - Thymidine ^{3}H. CEA 78-SACLAY.
✱✱ - PARKER I99 . Institut PASTEUR - 75 - PARIS I5è
✱✱✱ - Hydroxyde de Hyamine . PACKARD Inst. CO - Downers Grove Ill.U.S.A.

La radioactivité dans les flacons est comptée dans un Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer (PACKARD) à 18 p. 100 de rendement. Les résultats sont corrigés selon le rendement et l'affaiblissement et exprimés en coups par minute (CPM) pour 10^6 lymphocytes.

RESULTATS

Notre expérimentation a porté sur cinq sujets.

Dans chaque cas, nous avons utilisé la phytohémagglutinine non diluée et diluée à I/2, I/3, I/4, I/5 et I/10 et avons donc à considérer six résultats pour chaque sujet.

Nous avons ainsi à analyser 30 résultats pour la méthode optique et 30 résultats pour la méthode isotopique.

Les 60 résultats sont portés sur des tableaux récapitulatifs (Tableaux I et II).

Chaque cas fait l'objet d'une courbe qui permet la comparaison entre les deux méthodes.

L E C T U R E O P T I Q U E

(en pourcentage de transformation lymphoblastique)

	HIN ...(I)	DAS ... (2)	FRE... (3)	LEF... (4)	BUR...(5)
Témoin	2,7	I,9	4,2	0,4	0,3
PHA	67,5	50,I	69	56,5	57
I/4	65	50	64	52	53
I/2	64,5	46	68,5	48	50,0
I/3	50	36,4	47,5	38	44,5
I/4	43,6	24,6	39,5	34	39,5
I/5	44	LYSE	38,5	35	34
I/IO	28,I	20, 2	30	I6,6	30

TABLEAU I

Résultats en lecture optique du T.T.L. à la phytohemagglutinine non diluée ou diluée.

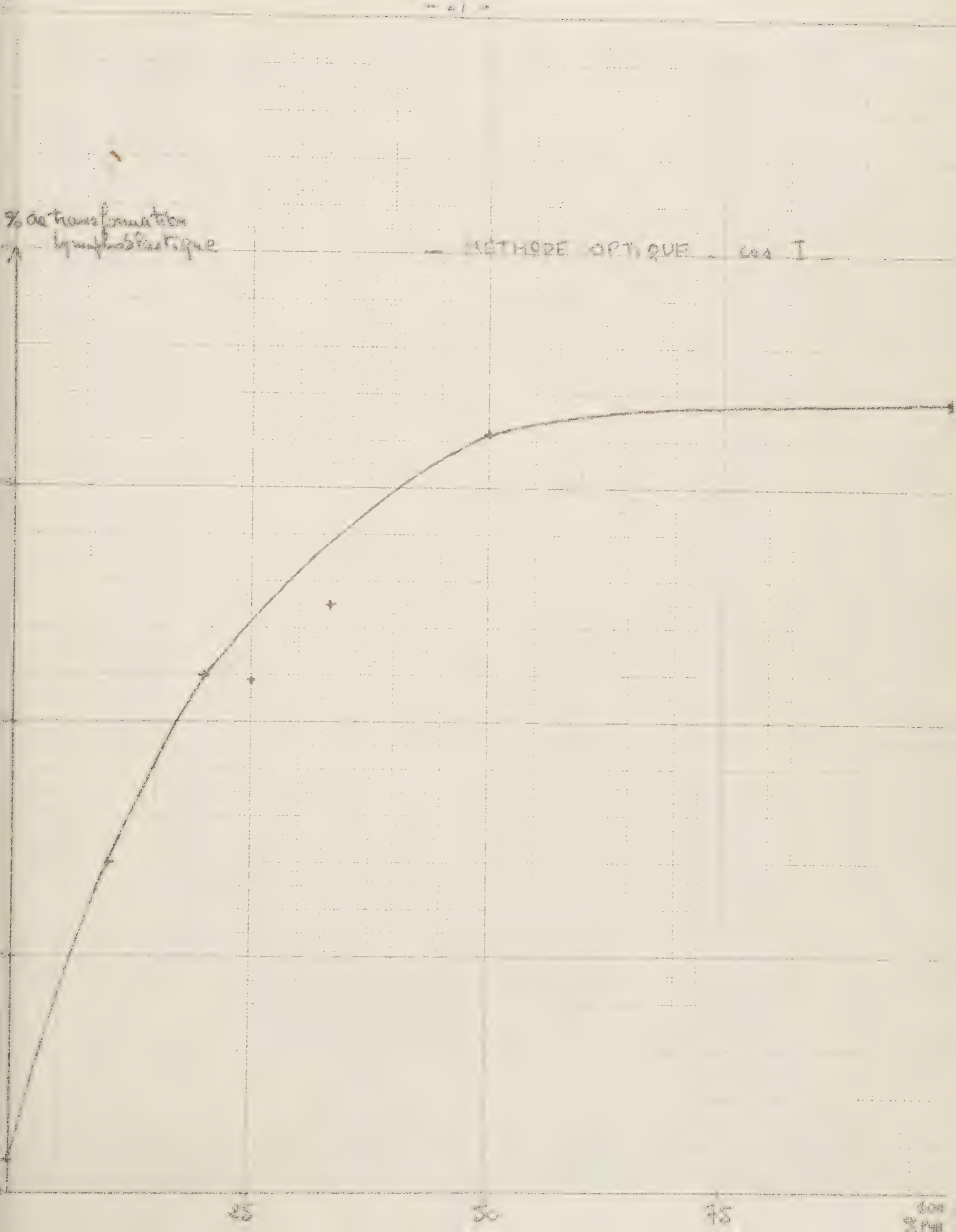
L E C T U R E I S O T O P I Q U E

(en CPM pour 10^6 lymphocytes)

	HIR ...(1)	DAS ... (2)	FRE ... (3)	LEF... (4)	BUE ...(5)
Témoin	2207	485	1079	350	498
PHA	5813	48365	18201	24429	71200
3/4	5212	48022	17380	22140	62431
1/2	3199	30981	15049	21605	57407
1/3	2512	41607	13928	14079	45617
1/4	2294	30735	20508	16820	43946
1/5	3126	179	9957	11758	37442
1/10	2757	12417	5218	5341	2940

TABLEAU II

Résultats en lecture isotopique du T.T.L. à la phytohémagglutinine non diluée ou diluée.

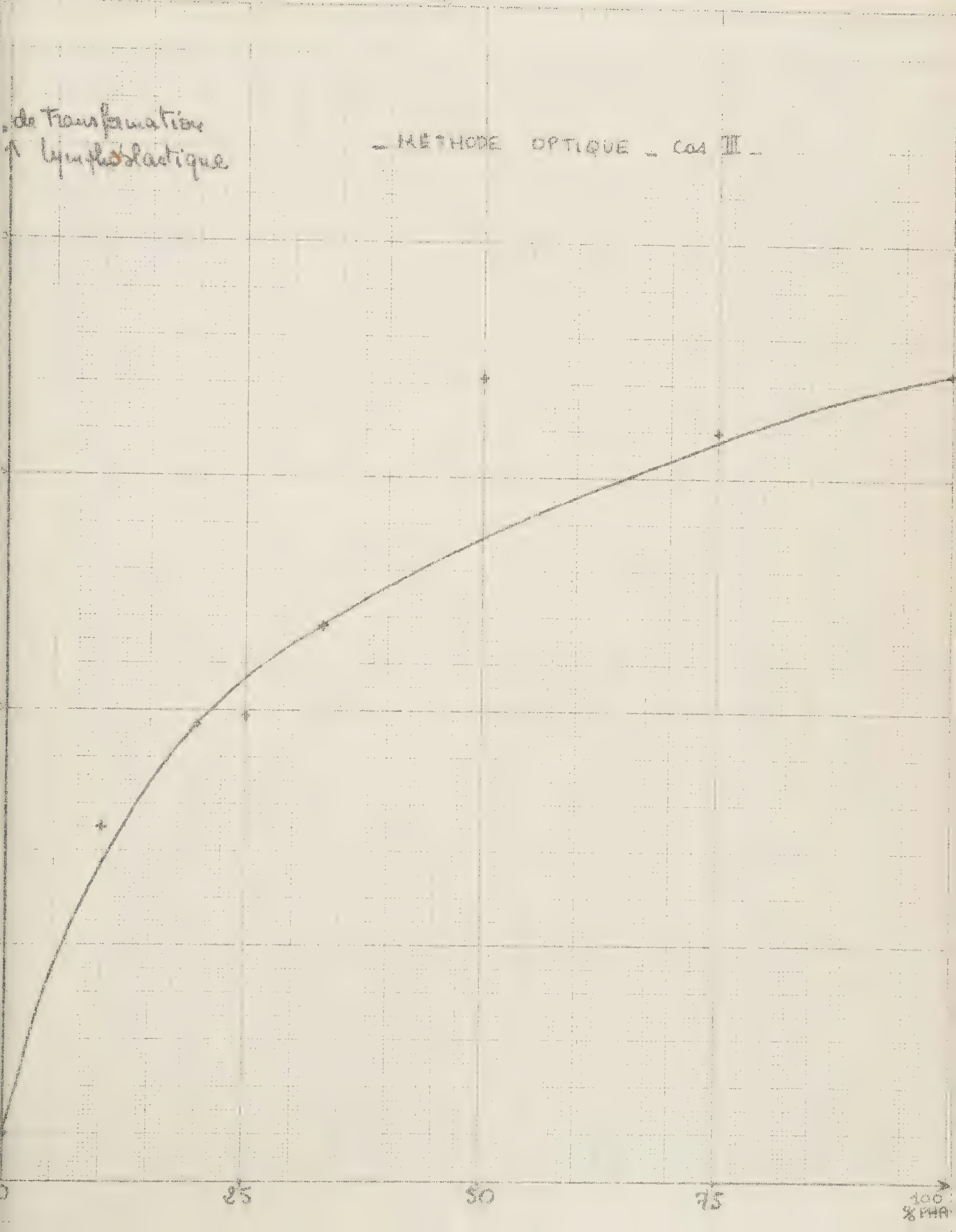

% de transformation
hyperbolique
MÉTHODE OPTIQUE - Cas I
25
50
75
100

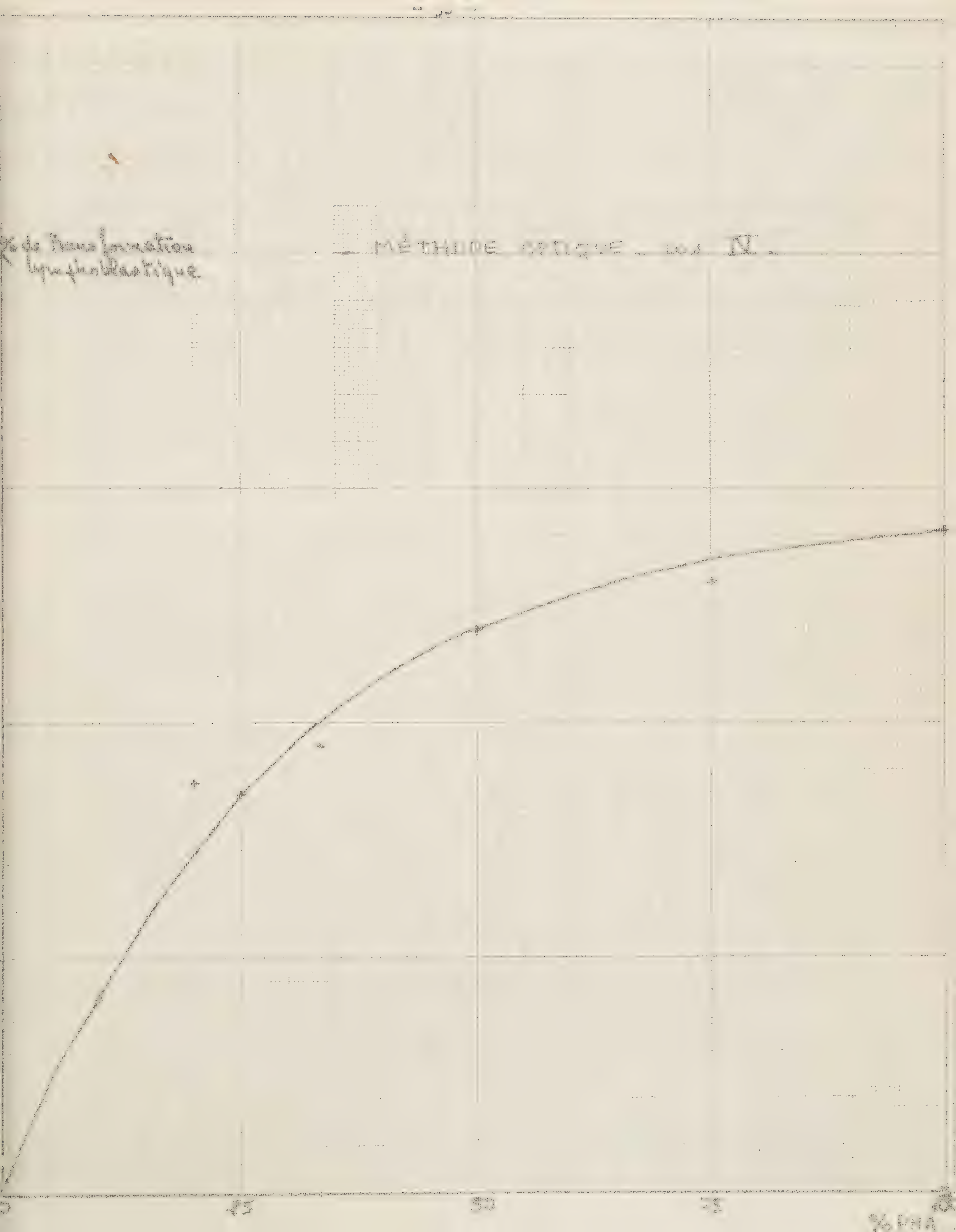
% de transformation
lymphoblastique

MÉTHODE OPTIQUE cas II

de Transformation
Uniplastique

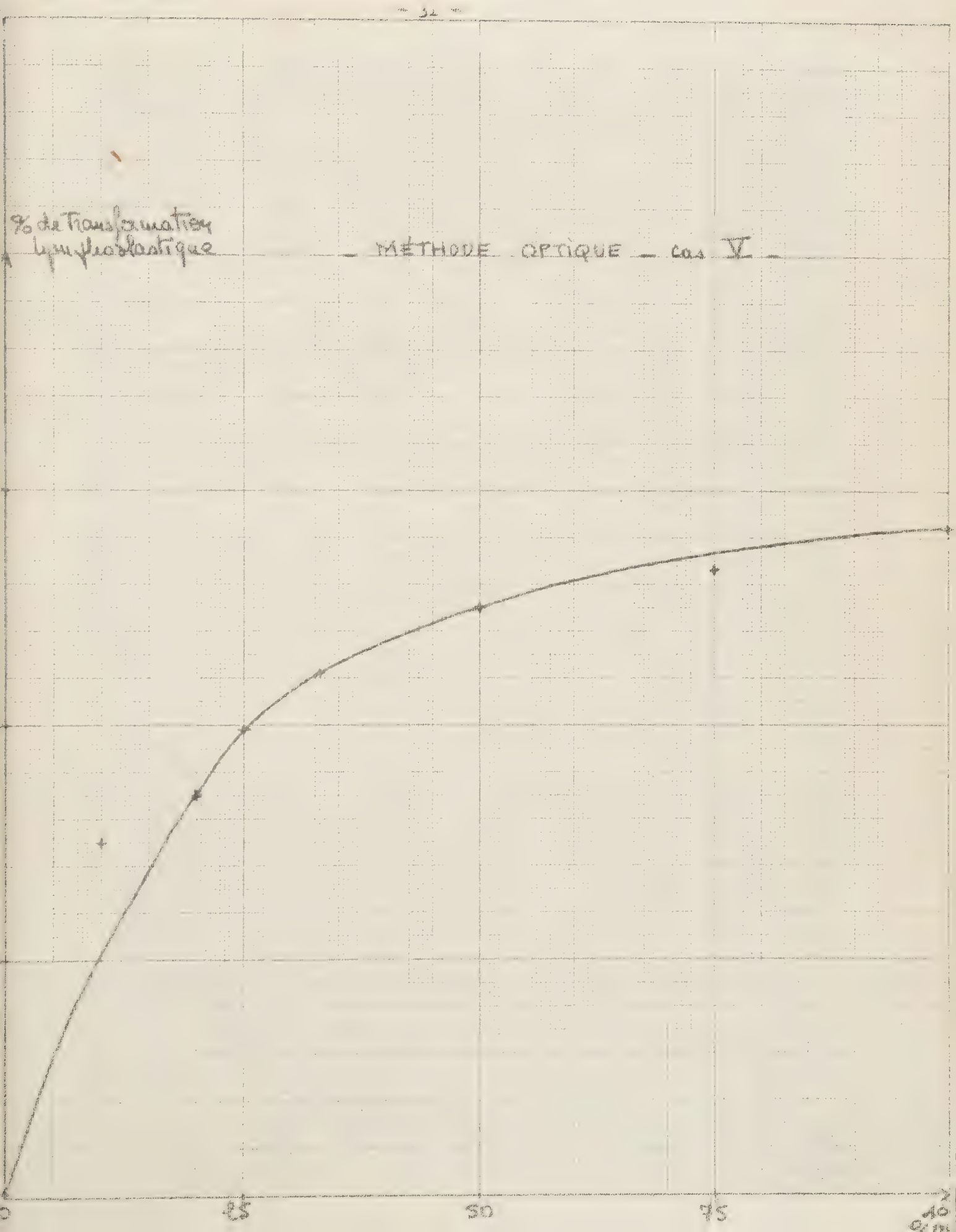
- METHODE OPTIQUE - CAS III -

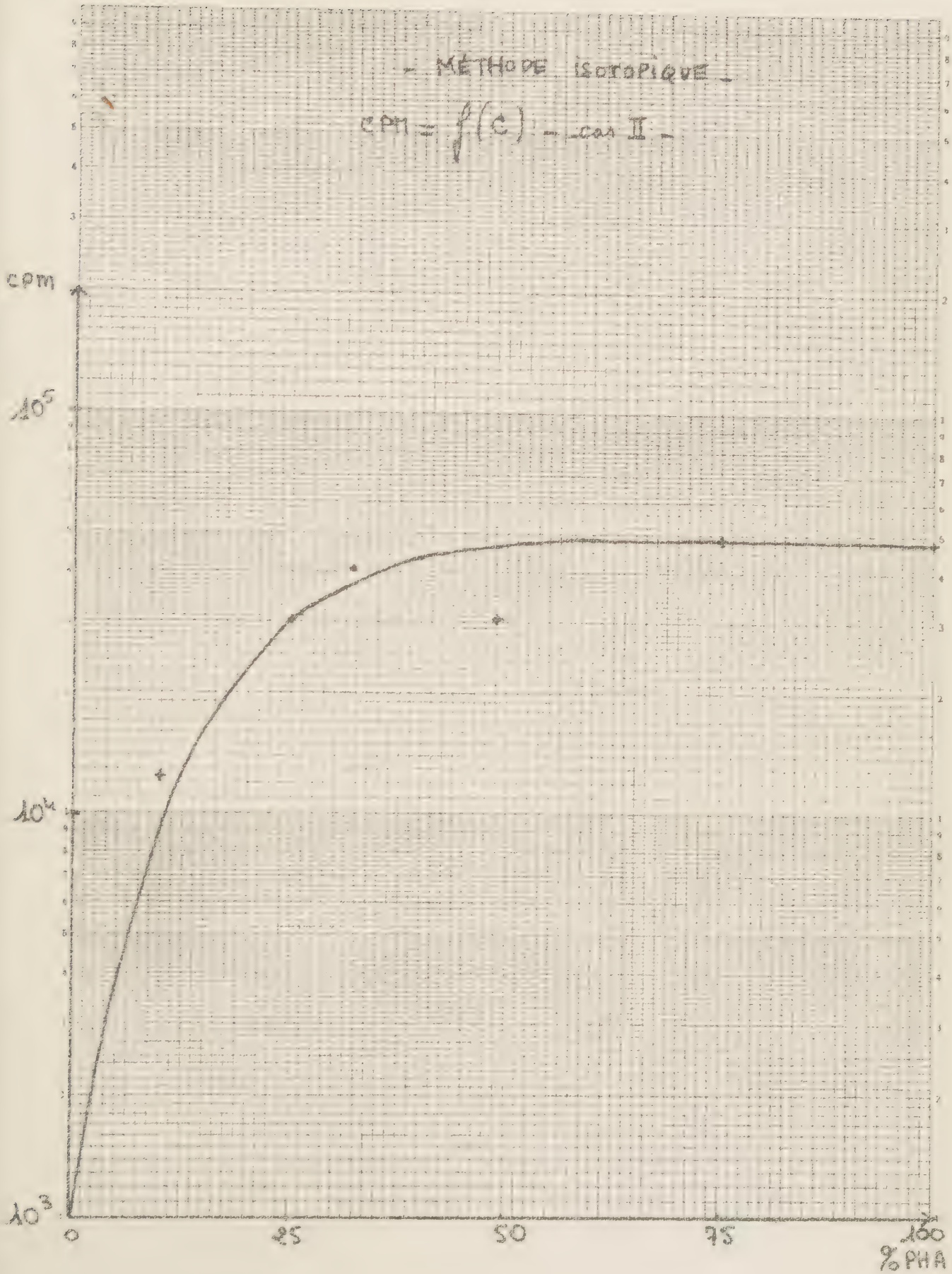


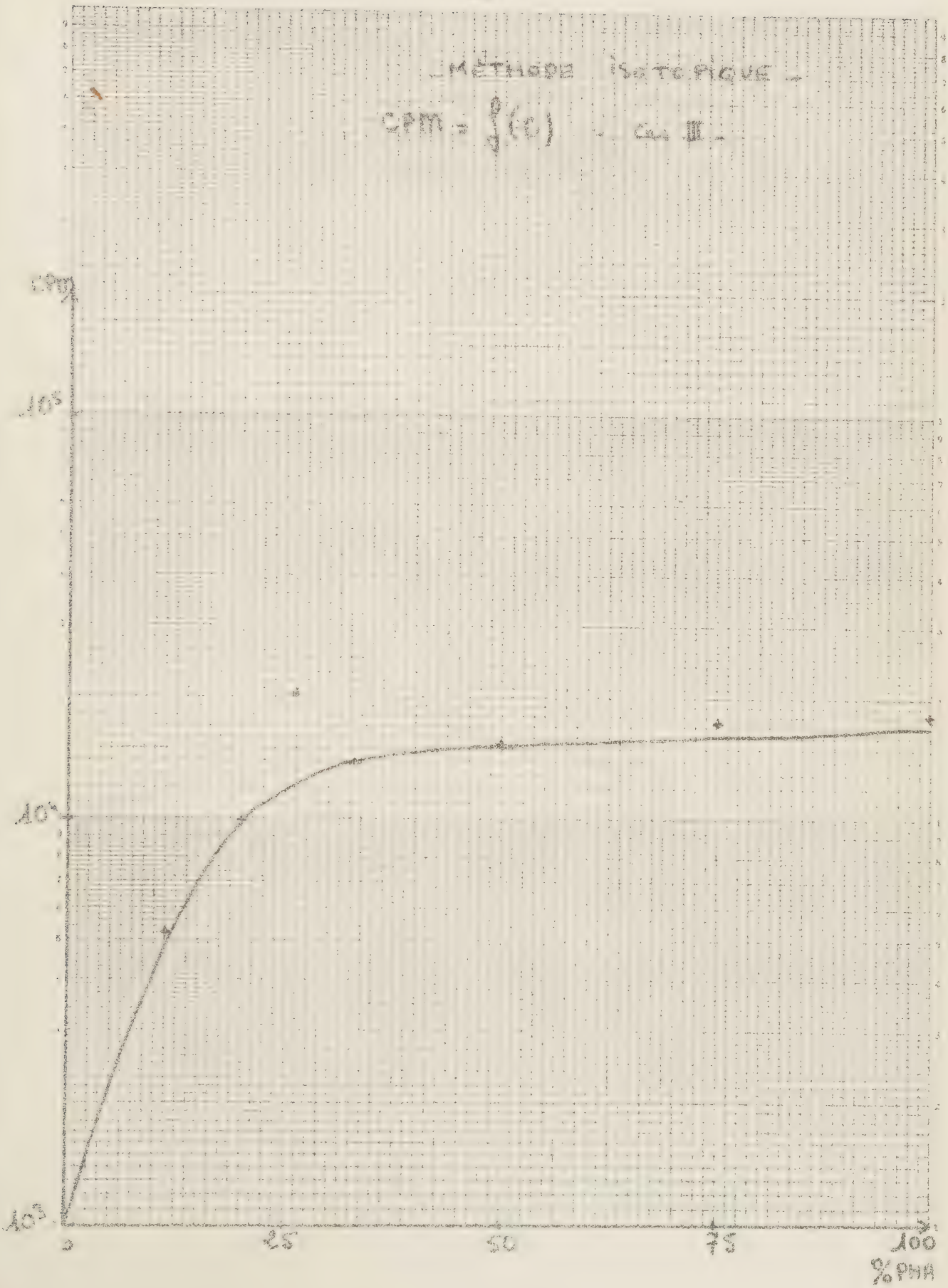

MÉTHODE OPTIQUE _ loi IV _
% de transformation liquide plastique
0
25
50
75
100
% PMA

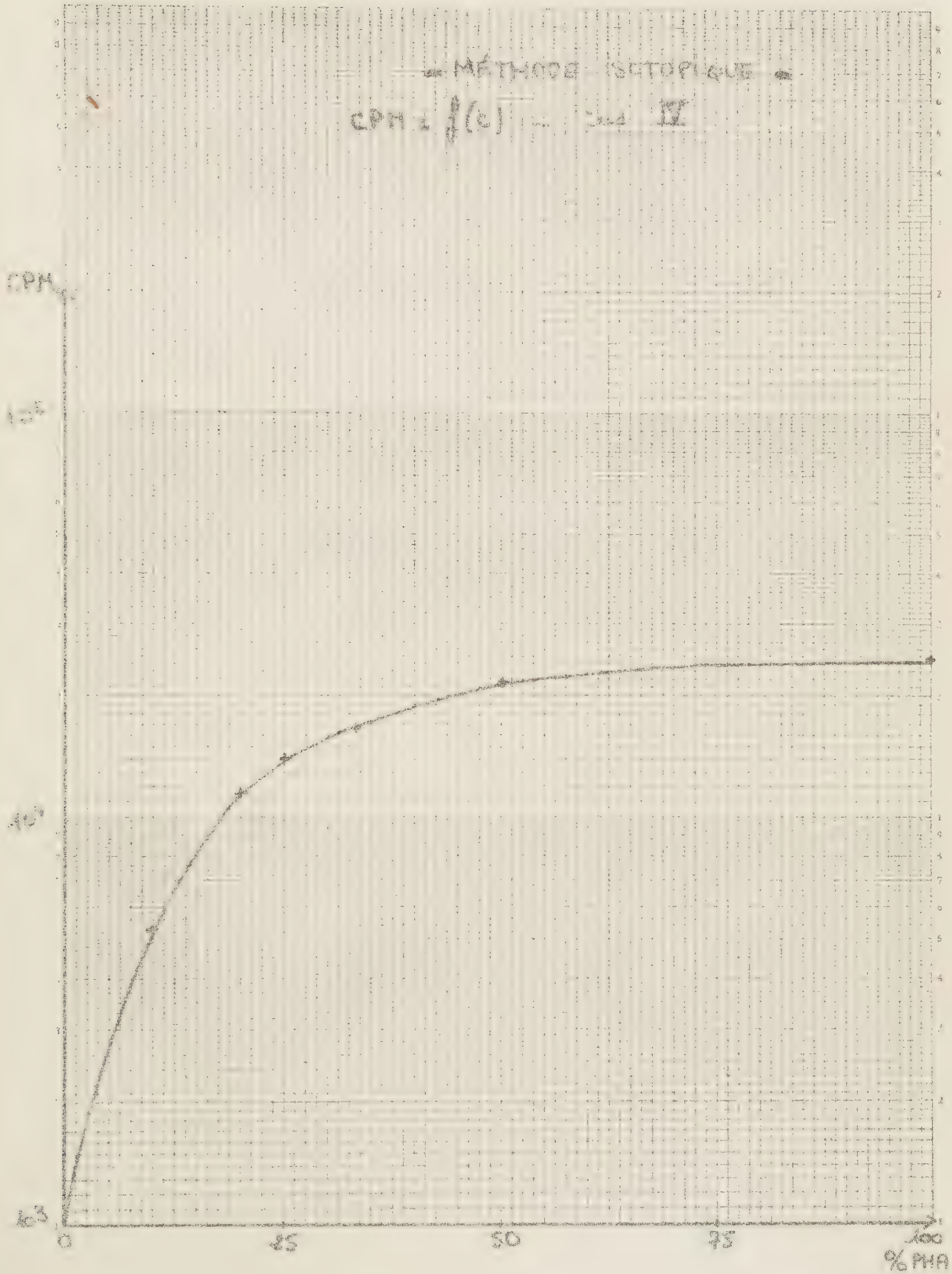
% de Transformation Martensitique

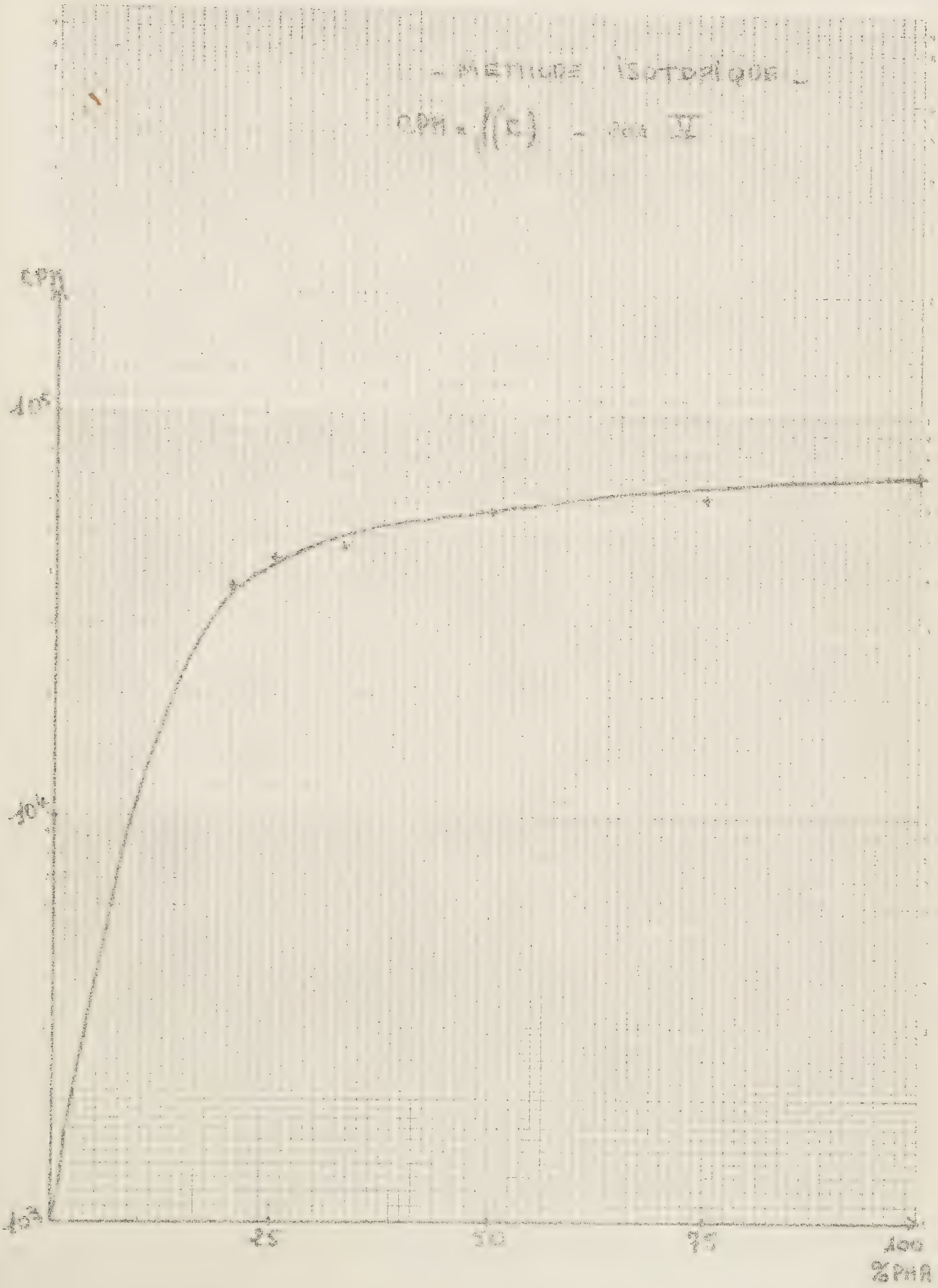
MÉTHODE OPTIQUE — Cas V —



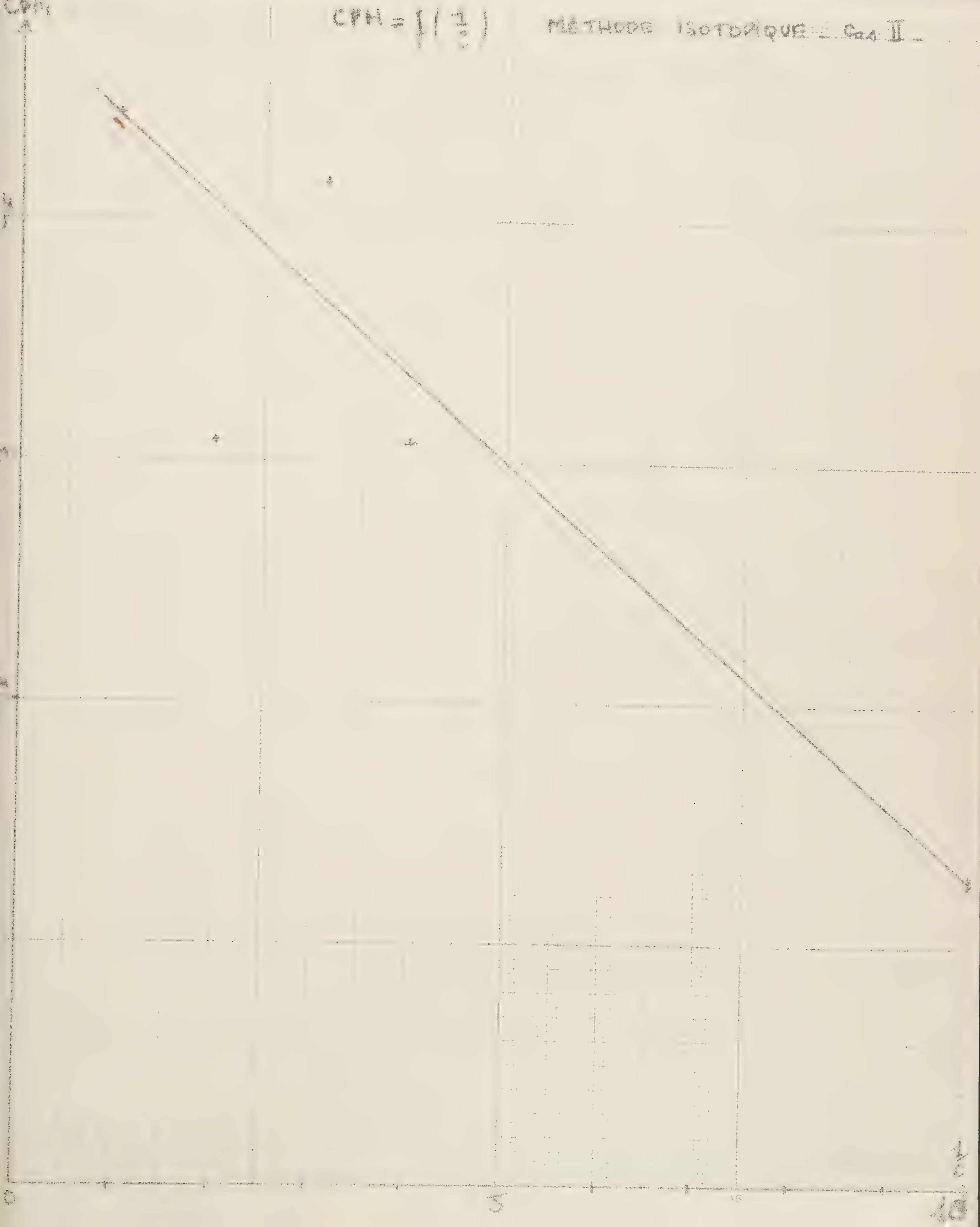

- METHODE ISOTOPIQUE -
cpm = f(c) - cas II -
cpm
10^5
10^4
10^3
0
25
50
75
100
% PHA


METHODE ISOTOPIQUE
cpm = f(c)
Cas III
cpm
10⁵
10⁴
10³
0
25
50
75
100
% PHA

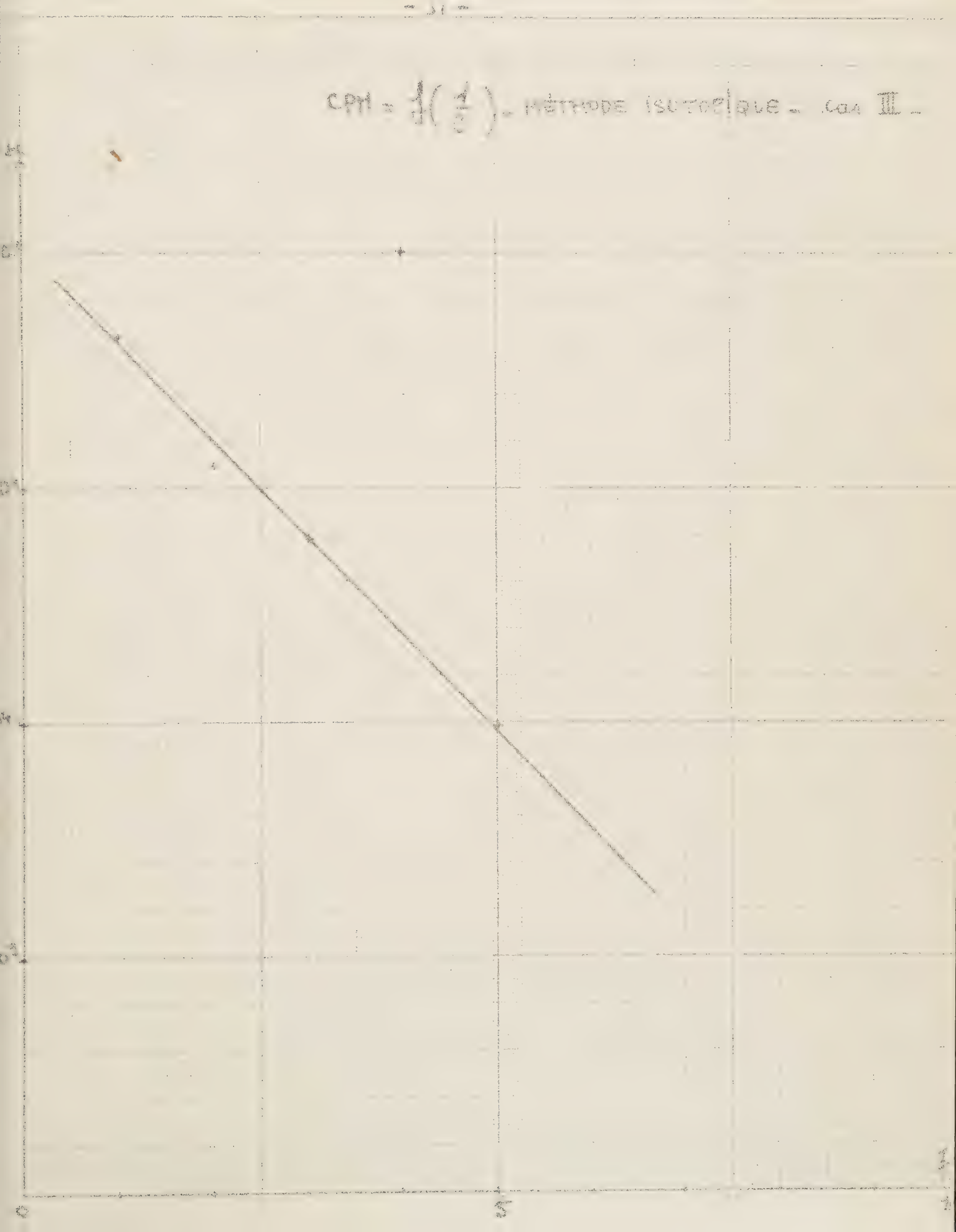

MÉTHODE ISOTOPIQUE
CPM = f(c)
CPM
10⁴
10³
0
25
50
75
100
% PMA

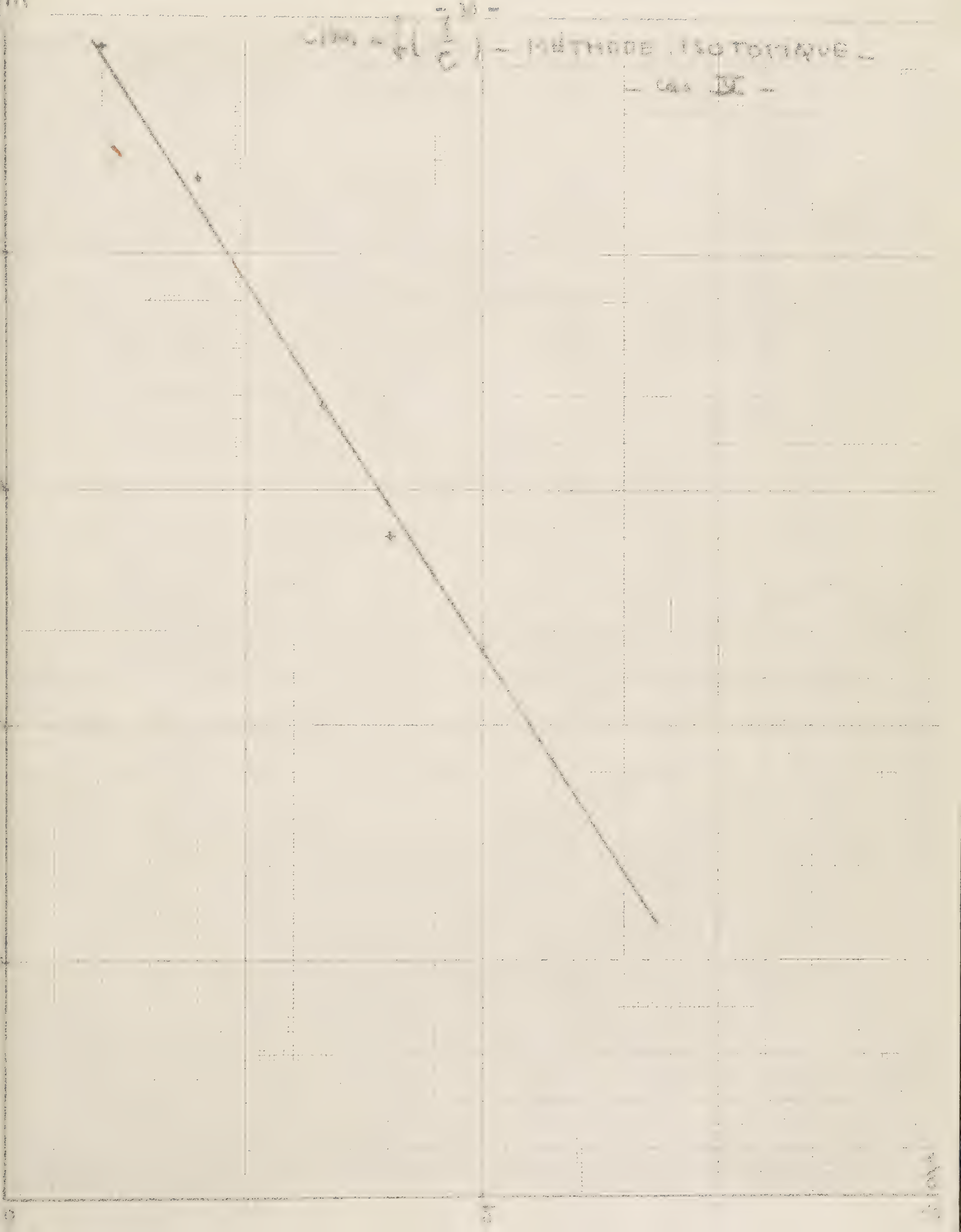


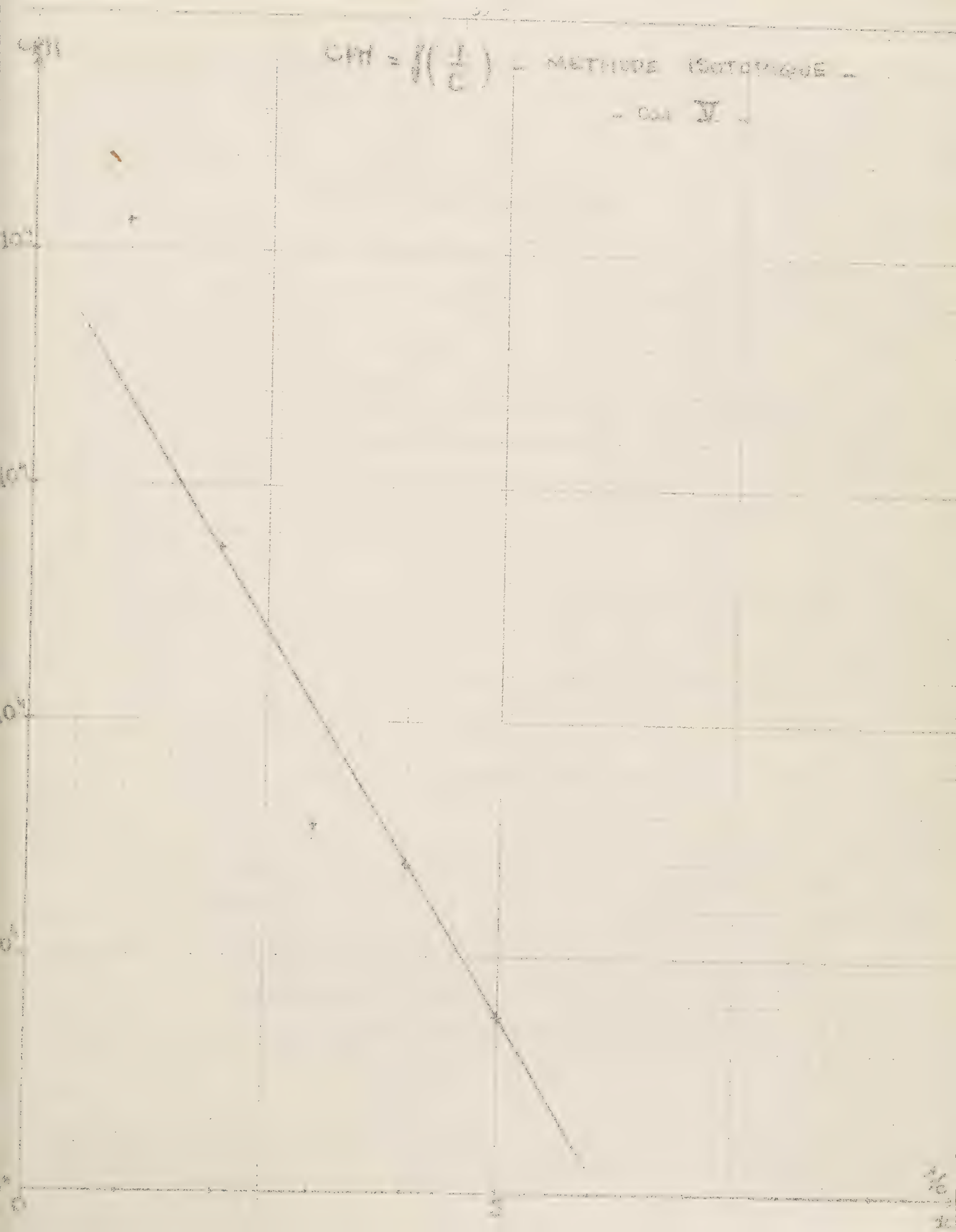
CPM = f (1/t)   MÉTHODE ISOTOPIQUE – Cas II –



CPM = $\frac{1}{t}\left(\frac{1}{2}\right)$ - MÉTHODE ISOTOPIQUE - cas III -




— MÉTHODE ISOTOPIQUE —
— Cas IV —


$C_M = f\left(\frac{1}{C}\right)$ - METHODE ISOTOPIQUE -
- Cas V -

- ANALYSE DE LA METHODE OPTIQUE :

Les résultats obtenus avec la méthode optique donnent une bonne corrélation dans tous les cas et pour toutes les [illegible].

En portant en abscisses le pourcentage de PHA et en ordonnées le pourcentage de transformation lymphoblastique, on obtient des courbes régulières, d'allure parabolique, qui tendent à s'équilibrer pour une concentration de PHA aux environs de 75 à 100 p. 100 ; ce plateau correspond à la saturation de l'[illegible] en PHA.

La cinétique de la courbe optique est donc excellente. La [illegible].

La méthode optique est une méthode très fidèle.

- ANALYSE DE LA METHODE ISOTOPIQUE :

En portant de la même façon que pour la méthode optique, en abscisses la concentration de PHA et en ordonnées le nombre de coups par minute (CPM), on obtient des courbes paraboliques semblables entre elles, où l'ascension de la courbe est bien parallèle aux taux croissants de dilution de PHA, atteignant un plateau pour des valeurs de PHA comprises entre 50 et 75 p. 100. (seule la courbe du cas I n'a pas pu être tracée)

La cinétique de la courbe isotopique est donc bonne, comme avec la méthode optique.

Par contre, la partie initiale de la courbe isotopique est plus rapidement ascendante, ce qui exprime une moins bonne sensibilité de la méthode pour des concentrations faibles de PHA.

Nous avons essayé d'établir l'équivalence entre les deux méthodes. Pour cela, nous avons transformé les courbes isotopiques en droites, plus faciles à comparer par leur pente. Nous avons dû y renoncer car les pentes obtenues par la méthode isotopique étaient toutes différentes.

Des travaux récents nous permettent de penser que de nouvelles possibilités seraient offertes par une méthode utilisant l' ARN marqué sur l'uridine (7).

C O N C L U S I O N

La transformation lymphoblastique de cultures de lymphocytes sous l'influence de la phytohémagglutinine à diverses dilutions a été évaluée par deux méthodes de lecture, la méthode optique, la méthode isotopique.

La méthode isotopique permet de connaître la transformation lymphoblastique en présence de fortes concentrations de PHA. Il est possible, grâce à cette méthode, d'avoir des résultats rapidement. Cela permettrait par exemple de faire des études statistiques sur un grand nombre de sujets. Mais la méthode manque pour l'instant de sensibilité pour les faibles concentrations de PHA, et par assimilation, pour les antigènes qui donnent de faibles taux de transformation lymphoblastique.

La méthode optique, quant à elle, malgré les difficultés et la lenteur de sa réalisation, garde à notre sens toute sa valeur en allergie, pour de faibles taux de transformation ; mais elle impose la présence d'un technicien " averti "; c'est une méthode précise et sensible dans tous les cas.

Nous n'avons pas pu établir des tables comparatives entre les deux méthodes.

On peut espérer, d'après des références bibliographiques récentes, que la méthode isotopique offre de nouvelles possibilités par l'utilisation d' ARN marqué sur l'uridine.

B I B L I O G R A P H I E

I - [illegible] J. et [illegible] - Abrégé d'hématologie.I96I, Masson éd., Paris, 33 - 36.

2 - [illegible] - Changes of [illegible] content in human peripheral lymphocytes under the influence of phytohaemagglutinin. in The role of lymphocytes and macrophages in the immunological response. I97I, Dumonde D.C. éd., Berlin - Heidelberg - New-York, 73 - 77.

3 - [illegible] M.W. and al. - The response of lymphocytes to antigens in vitro . Lancet, I963, I, 806.

4 - HALPERN B.N., KY N.T., LAGRUE G. et LANGLOIS C. - La transformation lymphoblastique in vitro des lymphocytes sanguins appliquée à l'étude de l'allergie microbienne . Presse Méd., I966, 74, III9 - II22.

5 - HUGHES D. and CASPARY E.A. - Lymphocyte transformation in vitro measured by tritiated thymidine uptake . Int. Arch. Allergy, I970, 37, 506 - 53I.

6 - INGRAM V.M. ; GRUNBERG - MANAGO M. - Biosynthèse des macromolécules. I970, Ediscience éd., Paris, 2I - 23.

7 - KAY J.E. and HANDMAKER S.D. - Uridine incorporation and RNA synthesis during stimulation of lymphocytes by PHA . Experimental cell Research, I970, 63, 4II - 42I.

8 - [illegible] E., [illegible] J., [illegible] et [illegible] de MONTREYNAUD J.M. - Intérêt du test de transformation lymphoblastique dans le diagnostic de l'hypersensibilité retardée et dans l'allergie médicamenteuse . Méd. et Hyg., I970, 28, 57 - 59.

9 - MOSIER D.E. and COPPLESON L.W. - A three cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro . Proc. Nat. Acad. Sc., I968, 6I, 542 - 547.

IO - MUELLER A.P., WOLFE H.R. and MEYER R.K. - Precipitin production in chickens . XXI Antibody production in bursectomized chickens and in chickens injected with I9 Nortestosterone on the fifth day of incubation - J. of Immunology, I960, 85, I72 - I79.

II - RIGAS D.A. and OSGOOD E.E. - Purification and properties of the phytohaemagglutinin of Phaseolus vulgaris . J. Biol . Chem., I955, 2I2, 607 - 6I5.

I2 - SCHUMACHER K., [illegible] G., [illegible] F., UHLENBRUCK G., ALKER G., HIRSCHMANN W.B. and GROSS R. - Studies on the biological properties of the isolated active fractions of phytohaemagglutinin (PHA) from Phaseolus vulgaris . in The role of lymphocytes and macrophages in the immunological response . I9[illegible], Dumonde D.C. éd., Berlin - Heidelberg - New-York, 83 - 86.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

VU, le Président de Thèse :

J.M. DUBOIS de MONTREYNAUD

Vu et permis d'imprimer,

Le Doyen de la Faculté Mixte

de Medecine et de Pharmacie de REIMS

Président de l'E.P.C.S.C.

H. GEOFFROY

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION I

PRINCIPES DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE 2

TECHNIQUE DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE 6

METHODES DE LECTURE 8

Méthode optique 9

Méthode isotopique II

TECHNIQUE DE COMPTAGE PAR SCINTILLATION EN PHASE LIQUIDE I7

PROTOCOLE EXPERIMENTAL 2I

RESULTATS 24

CONCLUSION 42

BIBLIOGRAPHIE